

## A fehérjedegradáció szerepének vizsgálata cukor/stressz jelátviteli folyamatok során

### *Arabidopsis thaliana* modellnövényben

#### Zárójelentés (F 042987)

A fehérjedegradáció, ezen belül az ubiquitin-függő fehérjelebontó rendszer (ubiquitin proteasome system: UPS) fontos szerepet játszik szinte minden növényi fejlődési folyamat szabályozásában, kezdve az embriógenezistől a virág fejlődéséig. A helyhez kötött életmódot folytató növények proteomikus rugalmasságuk segítségével úgy képesek átalakítani fejlődési programjukat, hogy azonnal válaszolni tudanak a megváltozott környezeti viszonyokra. Az irányított ubiquitin- és proteoszóma-függő fehérjedegradáció ezért létfontosságú szerepet tölt be a növények túlélési képességében. A legújabb kutatási eredmények bebizonyították, hogy a különböző hormonális jelátviteli utak egymásba kapcsolódnak ('cross talk') és kimutatható a UPS rendszer és a biotikus védekező folyamatok közötti kapcsolat is. Az UPS rendszeren keresztül történő fehérjelebontás két lépésben történik: a fehérjéhez először kovalensen egy ubiquitin lánc kapcsolódik, majd a fehérjét a 26S proteoszóma lebontja. Az ubiquitin konjugációjában számos enzim csoport vesz részt (E1-ubiquitin activating, E2-ubiquitin conjugating, E3-ubiquitin ligase enzimes), melyek közül a legérdekesebbnek a szubsztrát felismeréséért felelős E3 ubiquitin ligáz komplexek bizonyultak. Hasonló szerkezeti motívumok alapján növényekből és metazoákból napjainkig több száz E3 enzimet határoztak meg ismert genomszekvenciák segítségével. Ezek a fehérjék különböző családokat alkotnak, melyek közül az SCF (SKP1-CUL1-F-box) a legnagyobb és legjobban jellemzett ligáz család. Meglepő módon az *Arabidopsis* genomja körülbelül 700 F-box fehérjét kódol, ami jóval több, mint a többi ismert genomszekvenciájú eukarióta rendszeren belül jósolt F-box fehérjék száma. Ebből arra lehet következtetni, hogy növényekben feltehetőleg az SCF-függő ubiquitiláció a szelektív fehérjedegradáció fő útvonala.

Pályázatunk célja, hogy összekapcsoljuk az irányított fehérjedegradációt a cukor és/vagy más abiotikus stressz által elindított jelátviteli folyamatokkal. Vizsgálataink alapja egy pleiotróp, fejlődési rendellenességeket mutató *Arabidopsis* inszerciós mutánsnövény, a *prl1* (pleiotrop regulatory locus 1), amely hiperszenzitív glükózra, szacharózra, hideg stresszre és különböző növényi hormonokra, így auxinra, abszcizin savra (ABA), etilénre és citokininre (Nemeth et al., 1998). A *prl1* mutáns növény levél és gyökérfejlődése eltér a vad típustól, továbbá a PRL1 hiánya miatt megemelkedik számos cukor, etilén és ABA regulált gén expressziója. Mindezekből arra lehet következtetni, hogy a PRL1 fontos koordináló szerepet játszik számos jelátviteli folyamatban. Dr. Koncz és munkatársai élesztő kéthibrid

rendszer felhasználásával több PRL1 kölcsönható partnert azonosítottak, közöttük az SnRK1 $\alpha$  (sucrose nonfermented kinase 1) AMP aktivált kináz *Arabidopsis* orthológját és az UFD1 (ubiquitin fusion degradation 1) fehérjét, majd a kölcsönhatásokat *in vitro* pull-down assay-vel igazolták (Bhalerao et al., 1999). Kimutatták, hogy a PRL1 gátolja az SnRK1 $\alpha$  működését és verseng az SCF E3 ligáz SKP1/ASK1 alegységével a proteoszóma-asszociált SnRK1 kötődésben (Farras et al., 2001). Ezek a kísérleti adatok összekapcsolják a PRL1 fehérje funkcióját az SCF/proteoszóma-függő degradációs úttal. A PRL1 fent említett másik kölcsönható partnere az *Arabidopsis* Ufd1 (At4g15420) gén által kódolt fehérje, amely az élesztő UFD1-gyel mutatott homológiát, és amelyről kimutatták, hogy az ubiquitin-függő fehérjedegradáció folyamatában játszik szerepet. Az Ufd1 élesztőben a vegetatív sejtek életképességének fenntartásában esszenciálisnak bizonyult (Johnson ES et al., 1995). Dr. Koncz és munkatársai az *Arabidopsis* Ufd1-gyel végzett kettős hibrid vizsgálattal azt mutatták ki, hogy kölcsönhatásban áll a 26S proteoszóma 20S alegységének  $\beta 5$  komponensével és poliubiquitin prekursor fehérjékkel. Emlős rendszerben az UFD1 fehérje a sejtmagi transzportfolyamatokban szerepet játszó NPL4 fehérjével alkot heterodimert, melyek a p97/Cdc48 AAA típusú ATPáz ubiquitinált szubsztrát felismerő kofaktorai. A Cdc48/p97-UFD1-NPL4 fehérjekomplexről kimutatták, hogy különféle sejt folyamatokban vesz részt, ilyenek például a membrán fúziós folyamatok, organellek kialakulása, újrendeződése, fehérjedegradáció és a sejtciklus szabályozása (Meyer et al., 2000). Ezek közül a legtöbbet vizsgált folyamat, az ERAD (ER associated protein degradation), amely a szerkezetileg hibás fehérjéket távolítja el az endoplazmatikus retikulumból. A sejt minőségellenőrző rendszere a lebontásra ítélt célfehérjéket az ER lumenben kiválasztja, majd a membránon keresztüli transzlokáció után az UPS által a citoplazmában degradálódnak le (Meusser et al., 2005). Az UFD1-NPL4 dimer az ubiquitinált targetfehérjék felismeréséért és kötődéséért felel, majd az ubiquitinált célfehérjéket a Cdc48/p97-UFD1-NPL4 komplex szállítja a 26S proteoszómához. Az UFD1 sejtmagban betöltött szerepét *Xenopus* petesejtekben tanulmányozták, és azt mutatták ki, hogy mitózis során a mitotikus orsók szétválásánál a Cdc48/p97-UFD1-NPL4 komplex molekuláris chaperonként távolítja el a mikrotubulushoz asszociálódott fehérjéket, melyeket a 26S proteoszómához irányít (Bays and Hampton, 2002). *Caenorhabditis elegans*-on végzett kísérletekkel kimutatták, hogy a Cdc48/p97-UFD1-NPL4 komplex a mitózisból való kilépéskor távolítja el az Aurora B kromatin-asszociált kinázt, amely a kromoszómák dekonzenzációját és a sejtmagmembrán újraképződését gátolta (Ramadan et al., 2007). Ez azt jelzi, hogy a Cdc48/p97-UFD1-NPL4 komplex az ubiquitin-függő fehérjedegradáció folyamata által esszenciális szerepet játszik a sejtmag újraképződésében.

Pályázatunk kezdetén a szakirodalomban az Ufd1 növényi szerepéről semmilyen információ nem állt rendelkezésünkre, ezért az *Arabidopsis* Ufd1 molekuláris biológiai, genetikai és biokémiai módszerekkel történő tanulmányozását és a PRL1 fehérjével történő kölcsönhatásának vizsgálatát tűztük ki célul. Ehhez első lépésként létrehoztuk a vizsgálatainkhoz szükséges alapeszközöket, különböző epitópokat tartalmazó növényi expressziós konstrukciókat (C-, vagy N-terminálison fúzionáltatott, intront tartalmazó HA és c-Myc epitóppal, illetve GFP-vel jelölt UFD1 és PRL1 fehérjéket), amelyekkel *Arabidopsis* sejtszuspenziót és növényeket transzformáltunk. A kétszeres CaMV35S promóterrel meghajtott PRL1 fehérje túltermelése sejtszuspenzióban letális volt, *Arabidopsis* növényben pedig nem lehetett detektálni a HA-PRL1 jelet. Ezért újabb klónozás után az egyszeres minimál 35S promótert és a saját promóterének egy rövidített változatát használtuk fel a PRL1 fehérje termeléséhez. Ezekkel a konstrukciókkal transzformált sejtszuspenzióból sikerült stabil sejtvonalat előállítani, azonban ez a sejtvonal nagyon érzékeny volt a külső hatásokra. A CaMV35S::HA-PRL1-gyet túltermelő növényekből antibiotikum szegregáció alapján elkülönítettük azokat az egyedeket, amelyek 1 kópiában tartalmazták az expressziós vektort és ezekből homozigóta vonalakat izoláltunk a későbbi vizsgálatainkhoz. Mivel a *prl1* mutáns már a birtokunkban volt, ezt a hátteret felhasználva teszteltük, hogy a Prl1 cDNS-t tartalmazó konstrukcióink funkcionálisak-e, azaz komplementálják-e a *prl1* mutáns fenotípusát. A homozigóta egyedeket elemezve azt találtuk, hogy csak részben sikerült a komplementálás, a *prl1/35S::HA-PRL1* növények gyökere továbbra is a *prl1*-hez hasonlóan rövid maradt. A többi fejlődésbeli különbség azonban eltűnt, ami arra utal, hogy bizonyos folyamatokhoz szükséges reguláló régiók a cDNS-ből hiányoznak (korábban a *prl1* genomi konstrukciójával teljes komplementálást mutattak ki). Csoportunkban a Prl1 gén regulációját különböző deléciós és pontmutációs konstrukciók felhasználásával Dr. Szakonyi vizsgálta, amelyhez az ösztrogén-indukálható pER8 növényi expressziós rendszert alkalmazta (Szakonyi, 2006). Kimutatta, hogy a *prl1* mutáns teljes komplementálásához a Prl1 génben a translációs start ATG-jétől visszafelé számított 62 bp-os régió és a második intron transzkripciót aktiváló doméneket tartalmaz, amelyek elengedhetetlenek a PRL1 fehérje teljes funkcionális működéséhez. Ezek alapján a HA-PRL1 fehérje tisztításához a reguláló régiókat tartalmazó konstrukciókkal transzformált sejtszuspenziót és növényeket használtuk fel. A vad típusú háttérben kifejeztetett HA-PRL1 fehérje nem változtatta meg a vad típusú *Arabidopsis* növény fenotípusát, ugyanúgy, mint a HA-UFD1-et túltermelő növények esetében sem találtunk fejlődésbeli eltérést. A HA-UFD1-et túltermelő sejtszuspenzió magas szinten termelte a fehérjét, amelyet az UFD1 biokémiai és sejtbiológiai jellemzésére

használtunk fel. Immunlokalizációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az UFD1-HA fehérje mind a sejtmagban, mind a citoplazmában megtalálható. A HA-PRL1 fehérje viszont majdnem kizárólag a sejtmagba lokalizálódik mind a sejtszuspenzióból, mind a növényből végzett szubcelluláris immunlokalizációs vizsgálat során. A *PRL1::GUS* promóter konstrukciót tartalmazó csíranövényeken végzett további expressziós vizsgálatok azt jelzik, hogy a *Pr1* gén majdnem minden szövetben kifejeződik, azonban legerősebben az apikális merisztémákban, vagyis az aktivan osztódó sejteket tartalmazó gyökércsúcsban és hajtáscsúcsban, illetve a levél, és oldalgyökér kezdeményekben. Az *Ufd1* gén kifejeződését különböző növényi szöveteken RT-PCR technikával vizsgáltuk és azt találtuk, hogy az *Ufd1* is a növény minden szervében megtalálható, legerősebben a virágzatban van jelen. A kondicionált génexpressziós változást többféle körülményeknek kitett csíranövényekben vizsgáltuk meg. A következő kezeléseket alkalmaztuk: magas (3%) és alacsony (0.1%) cukor, hideg és hő stressz, auxin, ABA, etilén (ACC), metil-jázmónát kezelés. A különböző időpontokban vett minták RT-PCR termékeit összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy sem a cukor, sem az általunk vizsgált hormonok nem növelték, illetve csökkentették az *Ufd1* expressziós szintjét, hasonlóan a *Pr1* sem mutatott transzkripcionális reguláltságot. Egyedül hő és hideg stressz hatására emelkedett meg az *Ufd1* transzkripciós szintje, ami összefüggésben lehet az UFD1 állati rendszerekben leírt ERAD folyamatban betöltött chaperon szerű funkciójával. Hő hatására ugyanis a hibás térbeli szerkezetű és nem funkcionális fehérjék mennyisége megemelkedik a sejteken belül, ami az ERAD-on keresztül a fehérjék degradációját okozza. Hasonlóan a hő sokk fehérjékhez – amelyek magas hő hatására azonnali génexpresszió növekedéssel válaszolnak –, az ERAD folyamatához is feltételezhetően több p97/Cdc48-UFD1-NPL4 komplexre van szükség. Az RT-PCR-ral végzett eredményeinket a Genevestigator adatbázis (*Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox, <https://iii.genevestigator.ethz.ch/at/>) megerősítette, amely szerint az *Ufd1* génexpressziója hő stressz során 14.11-szeresére emelkedik meg. Egyre több irodalmi adat jelenik meg az ubiquitin-függő fehérjedegradáció szerepéről biotikus stressz elleni védekező folyamatokban is (Dreher K. and Callis J., 2007). A patogén támadást kivédő apoptózis folyamatát indukáló syringolin a Genevestigator program szerint az *Ufd1* génexpresszióját 12.17-szeresére emelte meg, ami az *Ufd1* lehetséges szerepét jelzi biotikus stresszválasz során. A korábban karakterizált *pr1* mutánsban megemelkedett transzkripciós szintet mutató gének között szerepelt a *Pr1* és *Pr2* (pathogen related) gén, amelyek a *Pr1*-nek a patogén védekező folyamatokban betöltött szerepére utalnak. Pályázatunkban a cukor és az abiotikus

szignálutakra fókuszáltunk, azonban érdemes lenne megvizsgálni az Ufd1 és Prl1 szerepét és esetleges kölcsönhatásukat biotikus stresszválaszok esetében is.

Kíváncsiak voltunk, hogy az UFD1 és a PRL1 fehérjék génjeikhez hasonlóan azonos expressziós mintázatot adnak-e növényekben. Az UFD1-HA túltermelő növényekben a fehérjét minden szövetben közel azonos erősséggel detektáltuk. A HA-PRL1-es növények esetében (mind mutáns, mind vad típusú háttérben) meglepő módon a rozetta levelek, a szár levelei, és a magtok nagyon alacsony szinten (a kimutathatóság határán) tartalmazta a PRL1 fehérjét. Mivel az mRNS mennyisége a növény összes szövetében nagyrészt hasonló volt, így ez a fehérjeszintű különbség a Prl1 poszttranszkripcionális szabályozására utal. További kísérleteink azt mutatták, hogy a PRL1-HA fehérje nem stabil, mivel az indukálható pER8/HA-PRL1-et túltermelő 3 hetes növényekben (amelyek nagyrésze levelekből áll) az indukció után a fehérje mennyisége lecsökkent, amely reverzibilis proteasóma inhibitor (MG132) hozzáadásával meggátolható volt. Ebből arra következtettünk, hogy a PRL1 fehérje maga is a 26S proteasómán keresztül degradálódik. Kimutattuk, hogy az *Arabidopsis* PRL1 fehérje is - mint a humán és élesztő ortológja - kölcsönhatásban áll a spliceosome asszociált CDC5 fehérjével, amely az mRNS érésében, illetve a transzkripcióhoz kapcsolt DNS javításban játszik szerepet (Szakonyi, 2006). Az AtCDC5-tel végzett immuntisztítás során specifikus antitestekkel a PRL1 fehérjén kívül számos fehérjedegradációs elemet sikerült azonosítani, így a 20S és a 19S proteasóma alegységeket, a COP9 szignáloszóma CSN5 alegységét és az SCF E3 ligáz Cullin1 tagját. Ezenkívül ubiquitin ellenanyaggal az immunprecipitált mintából ubiquitinált fehérjéket is detektáltunk, vagyis proteasóma szubsztrátok is asszociálódtak az AtCDC5 komplexhez. Ezek alapján további vizsgálatokat lehet tervezni a PRL1-nek az RNS splicing folyamatában és az ehhez kapcsolt fehérjedegradációban betöltött szerepének tanulmányozásához.

Az UFD1 fehérjét túltermelő sejtszuspenziós kultúra előnye, hogy a fehérje biokémiai karakterizálása érdekében egyszerre nagymennyiségű kiindulási anyag gyűjthető. Elsőként az UFD1-HA fehérje sejten belüli eloszlását vizsgáltuk meg differenciál centrifugálással nyert frakciókból végzett Western blot analízissel. Az UFD1 legnagyobb mennyiségben a citoplazmában volt látható, azonban a sejtmagot és az ER-t tartalmazó frakciókból is kimutattuk. Az ER-t tartalmazó 100.000 g mikroszóma frakcióból az UFD1-HA fehérjét alacsony detergens koncentráció mellett sikerült szolubilizálni, ami azt jelzi, hogy a fehérje nem integrálódik a membránba, hanem a felületéhez asszociálódik. Az UFD1 fehérje komplex tisztítását teljes fehérjekivonatból kezdtük magnézium, ATP és proteasóma inhibitor hozzáadása mellett. A szolubilis fehérje extraktumot DEAE Affigel Blue ioncserélő

oszlopon (lineáris grádienssel 0-500 mM NaCl-dal) frakcionáltuk és Western blottal követtük, mely frakciók tartalmazzák az UFD1-HA fehérjét, illetve a proteoszóma 20S alegységét. A ko-frakcionálódó mintákból immunprecipitálást végeztünk  $\alpha$ -HA-kötött protein G Sepharose mátrix felhasználásával, melynek eredményeképp kimutattuk, hogy az UFD1-HA fehérje együtt immunprecipitálódik a 26S proteoszóma 20S alegységével. Az UFD1-HA fehérje/komplex méretének meghatározását a kiindulási szolubilis fehérjekivonatból Sephacril S300-as oszlopon történő géliszűréssel határoztuk meg. A méretmeghatározás során körülbelül 150 kDa mérettartománynál detektáltuk az UFD1-HA fehérjét. Ez a méret kb. kétszerese a HA-val jelölt UFD1 fehérje méretének, ami az UFD1-NPL4 dimer jelenlétére utalhat, azonban kisebb, mint a várt UFD1-NPL4-Cdc48/p97 komplex együttléve, vagy az UFD1-proteoszóma komplex mérete. Sajnos *Arabidopsis* NPL4-szerű fehérje elleni ellenanyag nem állt rendelkezésünkre, ezért nem sikerült bizonyítanunk a heterodimer létét *Arabidopsis* sejtszuspenzióból. A fenti tisztítás során, a majdnem kizárólag sejtmagba lokalizálható PRL1 fehérje mennyisége az ioncserélő oszlopon való tisztítás után a detektálhatóság határa alá csökkent, ezért az ezt követő immunprecipitáció után sem sikerült PRL1 kölcsönhatást kimutatnunk. Ezek alapján az UFD1 fehérjekomplex tisztítását a következő évben tovább optimalizáltuk úgy, hogy nem teljes fehérjekivonatot készítettünk, hanem első lépésben különválasztottuk a sejtmagi, a szolubilis citoplazmás és a mikroszóma frakciókat, feltételezve, hogy az UFD1 a sejt különböző területein más-más komplex részét képezi. A sejtmagot hexilén-glikol jelenlétében izoláltuk, majd magas detergens koncentráció mellett feltártuk. Ezután ioncserélő oszlopon tovább tisztítottuk, majd az UFD1-HA fehérjét tartalmazó frakciókból immunprecipitálást végeztünk, amelyből ismételtelen nem tudtuk kimutatni a PRL1 fehérjét. A nagyobb mennyiségben levő oldható citoplazmás fehérje extraktum esetében is az eddigi tisztításhoz hasonlóan először ioncserélő kromatográfiával előtisztítást végeztünk, majd egy további géliszűréssel ismét a 150 kDa-os mérettartománynál detektáltuk az UFD1-HA fehérjekomplexet. Az előtisztított mintákból végzett immunprecipitálás során szintén csak a proteoszóma 20S alegységét sikerült kimutatnunk, míg különböző ellenanyagokat felhasználva sem a PRL1 fehérje, sem az SnRK kináz, sem a Cdc48, illetve az SCF komplex egyik alegysége (SKP1 és Cullin1) sem volt jelen az UFD1-HA fehérjével együtt precipitált mintában. Az ER-t tartalmazó sejtfrakcióból történő tisztítást formaldehiddel keresztkötött sejtszuspenzióból kiindulva végeztük el. Az élő sejtek keresztkötése után feltártuk a sejtszuspenziót és a mikroszómás frakciót alacsony detergens koncentráció mellett (0.2 % Igepal) szolubilizáltuk. Az így nyert fehérje extraktumból glicerol grádienssel (10-40% glicerol) méretszeparálást végeztünk és a keresztkötött UFD1-HA

fehérjét 3 különböző mérettartományban detektáltuk. Ezek közül legnagyobb mennyiségben az 50-150 kDa-os frakcióban halmozódott fel, kisebb mennyiségben volt jelen a 200-400 kDa-os, legkisebb mennyiségben a 600-800 kDa-os tartományban detektáltuk. Ezeket a frakciókat külön-külön összegyűjtve immunprecipitálást végeztünk, és a HA peptiddel eluált mintákat a keresztkötés feloldása után megfuttatva koloidális Coomassie festéssel tettük láthatóvá. Ebből az 50-75 kDa mérettartomány közötti 3 diszkrét fehérjecsíkot kivágtuk és LC MS/MS analízisnek vetettük alá. Sajnos a túladagolt HA peptid a fehérje minták elemzését zavarta, illetve az immunprecipitálás hatékonysága sem volt elegendő az MS vizsgálathoz, ezért a továbbiakban az immunprecipitáció és az elúció körülményeit optimalizáltuk. Különböző forrásból származó protein A/G Agaróz-okat teszteltünk és beállítottuk a legkisebb HA peptid koncentrációt, amellyel az immunprecipitációt követően még hatékonyan tudtuk a jelölt fehérjénket eluálni. A következő lépésben ötszörösére növeltük a keresztkötött kiindulási anyagmennyiséget, és a sejtmagi illetve mikroszóma frakció tisztítása és a fehérjék szolubilizálása után elhagytuk az ioncsere kromatográfiás előtisztítást. A szolubilizált frakciókból végzett immunprecipitálás után az eluált fehérjék egy részét Western blot vizsgálatnak vetettük alá, másik részét 2D gélen választottuk szét. A Western blot eredményeként kimutattuk a proteoszóma 20S alegysége mellett a 19S alegység jelenlétét is, a p97/Cdc48 ATPáz *Arabidopsis* homologját, viszont sem a PRL1 fehérjét, sem az SnRK kináz  $\alpha$  alegységét, sem ubiquitint vagy ubiquitinált fehérjéket, sem SCF E3 ubiquitin ligáz alegységeket nem detektáltunk. A megfestett 2D gélből kivágott fehérjéket tripszin emésztés után MALDI MS vizsgálatnak vetettük alá. A formaldehiddel keresztkötött minták miatt ekkor is csak többszöri optimalizálás után sikerült megfelelő minőségű 2D gél kapni és megfelelő mennyiségű fehérjét futtatni a gélen. A MALDI vizsgálat szignifikánsan azonosította a tubulin-4 és a nitriláz-1,2 fehérjéket. A nitriláz fehérje az IAA (indolecetsav) auxin növényi hormon bioszintézisében az utolsó kulcsfontosságú lépést végző enzim. Specifikus ellenanyag felhasználásával Western blottal is kimutattuk a nitriláz fehérjék jelenlétét az immunprecipitált mintákból, azonban az *ufd1* mutáns későbbi vizsgálata során semmilyen auxin választ nem észleltünk a mutáns növényen, ami azt mutatja, hogy ez a kölcsönhatás nem funkcionális, hanem a nitriláz fehérjéket mennyiségi túlsúlyuk következtében izoláltuk a keresztkötött membránfrakcióból. Nem szignifikáns találatokkal számos más fehérjét is azonosítottak az MS analízis során, azonban a sokkal nagyobb érzékenységű Western blottal kimutatott kölcsönható fehérjék jelenlétét a MALDI vizsgálat nem erősítette meg. A keresztkötött UFD1-HA fehérje ismételt tisztítása során Western blottal újra kimutattuk az UFD1 fehérje és a p97/Cdc48 fehérje *in vivo* kölcsönhatását *Arabidopsis*

sejtszuspenzióból és a 26S proteoszómához való kötődésüket. Az UFD1 és PRL1 fehérje lehetséges kölcsönhatását más kiindulási anyagokból is megpróbáltuk kimutatni. Az UFD1-HA/PRL1-Myc dupla túltermelő sejtszuspenzióból készített protoplasztokat feltártuk és a teljes fehérje extraktumból  $\alpha$ -HA és  $\alpha$ -cMyc ellenanyag felhasználásával immunprecipitálást végeztünk. Western blottal kimutattuk, hogy sem az UFD1 nem kötötte közvetlenül a PRL1 fehérjét, sem a PRL1 fehérjével nem tudtuk az UFD1 fehérjét kimutatni az immunprecipitált mintákból. Hasonló eredményt kaptunk az UFD1-HA fehérjét túltermelő *Arabidopsis* csíranövényekből végzett immunprecipitáció után is, ahol a PRL1 fehérjét  $\alpha$ -Prl1 ellenanyaggal próbáltuk azonosítani. Ezekből az eredményekből az következik, hogy az UFD1 és PRL1 fehérje az általunk vizsgált körülmények között (sem sejtszuspenzióból, sem növényi szövetekből történő tisztítás után) közvetlen módon nem hat kölcsön egymással, vagyis más-más útvonalon keresztül befolyásolják az ubiquitin függő és a 26S proteoszómán történő degradációs utakat.

Klasszikus genetikai megközelítésekkel olyan géneket izolálhatunk, melyek a számunkra érdekes és vizsgált biokémiai és fejlődési folyamatokban játszanak szerepet. Mutáns növények izolálása és vizsgálata hozzásegít a genetikai kölcsönhatások további jellemzéséhez (pl. szupresszor screen, epistasis vizsgálatok). Dr. Koncz és munkacsoportja a *prl1* mutáns növényt magas cukor kezelésnek kitett *Arabidopsis* mutáns populációból csírázási vagy fejlődési rendellenességet mutató egyedeket keresve izolálta. Az Ufd1 gén funkcionális jellemzéséhez és a PRL1 fehérjével való esetleges kölcsönhatásának genetikai bizonyításához elengedhetetlen volt számunkra az *ufd1* mutáns növény vizsgálata is. Dr. Koncz 90.000 *Arabidopsis* mutánst tartalmazó gyűjteményéből T-DNS és génspecifikus primerekkel történő többlépcsős PCR reakcióval 1 mutáns allélt sikerült izolálnunk (#77621), ahol a T-DNS inszerció az Ufd1 gén kódoló régiójának közepére esett. További 5 T-DNS mutáns allélt kértünk el az összes nyilvánosan elérhető mutánsgyűjteményből, amelyekben az inszerció 2 esetben a gén közepére esett (SALK 076012, SALK 063032), másik 2 esetben a végére (SAIL 1284G09, SAIL 1053H01), illetve 1 esetben a promóter régióba (GABI KAT185G08). Szelektív antibiotikumon való szegregálás alapján és PCR-ral végzett genotipizálással elkülönítettük a T-DNS inszerciót homozigóta formában hordozó egyedeket és a további fenotipusos vizsgálatainkban ezeket a növényvonalakat használtuk fel. Normál körülmények között az *ufd1* mutáns növények mind csírázási képességükben, mind vegetatív fejlődésükben a vad típusú növényhez voltak hasonlóak. További kondicionált fenotípus vizsgálataink azt mutatták, hogy mind magas cukor kezelésre, mind különböző hormonokra, mint auxin, etilén, ABA, mind magas vagy alacsony hőmérsékletre az *ufd1* mutánsok



fenotípusa azonos maradt a vad típussal. Miután összekereztük a *prl1* mutánst 4 homozigóta *ufd1* mutáns vonallal (Koncz77621, SALK 063032, SAIL 1284G09, SAIL 1053H01) és PCR-ral genotipizáltuk, a mindkét gént homozigóta formában hordozó második generációs egyedeket fenotípusos vizsgálatnak vetettük alá. A *prl1xufd1* dupla mutánsok normál körülmények között és magas glükóz tartalmú táptalajon, illetve ABA és auxin hormonok hatására is *prl1*-ként viselkedtek, az Ufd1 mutációja nem változtatta meg a *prl1* fenotípust. Amíg élesztőben és emlős rendszerben az Ufd1 gén esszenciális, *Arabidopsis*ban az *ufd1* knockout mutáns hormon és fejlődési válaszai normálisak, azaz feltételezhetően az Ufd1 funkcióját más gének helyettesítik. Pályázatunk elején az *Arabidopsis* genomból csak az általunk vizsgált Ufd1 (PIPK=PRL1 Interacting Protein K, At4g15420) génről volt ismert, hogy az élesztőből azonosított UFD domént tartalmazza. Ebből arra következtettünk, hogy *Arabidopsis*ban csak egy kópiában van jelen az Ufd1 gén. Azonban kísérleti eredményeink arra utaltak, hogy több hasonló funkcióval rendelkező gén is tartalmazhat UFD domént. Ez be is igazolódott a folyamatosan egyre bővülő *Arabidopsis* adatbázisok ismételt annotációi során, amelyből kiderült, hogy az *Arabidopsis* genom az általunk vizsgált Ufd1 génen kívül még 3 másik Ufd1-szerű gént is tartalmaz (At2g21270, At2g29070 és At4g38930), amelyek előzőleg virágzásban szerepet játszó géneknek voltak feltüntetve. Fehérjeszintű homológiájuk az általunk vizsgált UFD1-hez 30-40% között van, egymáshoz viszont igen magas, 80-90%-os homológiát mutatnak. Nincs még egységes nomenklatura a fehérjék pontos elnevezésére (Ufd1 family proteins), ezért mi továbbra is az általunk izolált gént nevezzük Ufd1-nek. A 18. Nemzetközi *Arabidopsis* konferencián megjelent egy absztrakt (Yerushalmi S. and Green R. 2007), amelyben bioinformatikai megközelítésekkel a virágzás cirkadián regulációjában szerepet játszó géneket vizsgálták. Ezek között szerepelt az egyik UFD1 family protein, amelyről feltételezik, hogy azon fehérjék degradációjában vesz részt, amelyek elősegítik a virágzást hosszú nappalos körülmények között.

Az első növényi UFD1-gyet megemlítő publikáció most 2008 januárjában jelent meg (Galvao et.al., 2008), amelyben az AtPI4K $\gamma$ 4 phosphoinositide 4 kinázt vizsgálva kimutatták, hogy direkt kölcsönhatásban áll az egyik UFD1 family protein-nel (At2g21270) és az RPN10 (regulatory particle nonATPase 10) fehérjével, amely a 26S proteoszóma 19S alegységének egyik komponense. Az AtPI4K $\gamma$ 4 kinázt a PI3/4 (phosphoinositide kinase 3/4) kinázcsaládon belül egy új csoportba osztják, mivel nem lipid, hanem fehérje kináz aktivitása van és UBL (ubiquitin-like) domént tartalmaz, amelyen keresztül kötődik az UFD1 family protein. Többek között kimutatták azt is, hogy az AtPI4K $\gamma$ 4 kináz foszforilálja mind az UFD1 family protein-t, mind az RPN10 fehérjét *in vitro*. Galvao és munkatársai szerint az AtPI4K $\gamma$ 4 kináz az RPN10

fehérjét használja fel a proteoszómához való kapcsolódási pontnak és így segíti az UFD1 family proteint az ubiquitinált célfehérjék 26S proteoszómához való szállításában. Érdekes egybeesés, hogy a *prl1* mutáns növényen végzett microarray vizsgálatunkból az AtPI4K $\gamma$ 3 (At5g24240) az egyetlen gén, amelynek az expressziója több, mint 20-szorosára emelkedett meg. Célszerű lenne megvizsgálni, hogy az AtPI4K kinázok által kimutatható-e az UFD1-PRL1 kapcsolat és ha igen, milyen szubsztrátokat szállítanak a proteoszómához.

Egy másik újabb publikáció (Lee JH et.al., 2008) a PRL1 szerepét vizsgálja a fehérjedegradáció során. Az ubiquitin függő fehérjedegradáció folyamatában a szubsztrát felismerő E3 ubiquitin ligázok legnagyobb csoportja a Cullin fehérjéket (CUL1-CUL5) tartalmazó komplexek. Ezeken belül növényekben a CUL4 alapú ligázok a legkevésbé ismertek. A CUL4, mint a többi cullin alapú E3 ligáz, komplexben áll a ROC1/RBX1 fehérjével, amely az E2 konjugáló enzimet köti, illetve kölcsönhat adaptor fehérjékkel, amelyek megkötik a szubsztrát felismerő fehérjéket. Ilyen adaptor fehérje a DDB1 (Damaged DNA Binding 1), amely WD40 motívumot tartalmazó (DWD=DDB1 binding WD40) fehérjéket képes megkötni. Bioinformatikai alapon szelektálva, több, DWD motívumot tartalmazó fehérjék között szerepelt a PRL1 is, amelyről koimmunprecipitálással kimutatták, hogy közvetlen kölcsönhatásban áll a DDB1-CUL4-ROC1 E3 ligázzal. Továbbá kimutatták azt is, hogy a *prl1* mutánsban az AKIN10 (*Arabidopsis* SnRK $\alpha$  kináz 10) lassabban degradálódik, mint a vad típusú növényben, amiből az következik, hogy a PRL1, mint a DDB1-CUL4-ROC1 E3 ligáz szubsztrát felismerő alegysége játszik szerepet az AKIN 10 degradációjában. Lee JH és munkatársai eredményével összhangban van az is, hogy a *prl1* mutáns pleiotróp fenotípusát valószínűleg a megnövekedett AKIN10 kinázaktivitás okozza (DDB1-CUL4-ROC1-PRL1 komplex hiányában). A PRL1 a WD40 doménjén keresztül más fehérjékkel történő kölcsönhatása során, illetve a Dr. Koncz és munkacsoportja által élesztő kettős hibrid rendszerrel kimutatott kölcsönható partnerek esetében is érdemes lenne megvizsgálni, hogy a különböző cukorregulált és más hormonális szignálutakban szerepet játszó fehérjék közül melyek degradációjában játszik szerepet a DDB1-CUL4-ROC1-PRL1 E3 ligáz komplex.

Összefoglalva fehérjetisztításaink során kimutattuk, hogy az *Arabidopsis* UFD1 fehérje egy kb. 400-600 kDa-os, 26S proteoszóma asszociált komplex része és *in vivo* kölcsönhatásban áll az *Arabidopsis* Cdc48/p97 ATPázal, amellyel együtt a sejt különböző részein különböző folyamatokban vehetnek részt. Az általunk használt körülmények során nem találtunk közvetlen kölcsönhatást az UFD1 és a PRL1 fehérjék között, azonban vizsgálataink nem terjedtek ki számos olyan élettani folyamatokra, mint például a biotikus stresszválaszok,

amelyekben mindkettő fehérje szerepet játszik. A továbbiakban specifikus szignálutak során kell keresnünk a két fehérje kapcsolódási pontját, amely segítségével az ubiquitin-függő fehérjelebontás útvonalait szabályozni képesek.

#### Referencia

**Bays NW and Hampton RY.** (2002) Cdc48–Ufd1–Npl4: Stuck in the Middle with Ub. *Current Biol.* 12: R366-R371

**Bhalerao RP,** Salchert K, Bako L, Okresz L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J, Koncz C. (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 5322-5327.

**Dreher K. and Callis J.** (2007) Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants. *Annals of Botany.* 99:787-822.

**Farras R,** Ferrando A, Jasik J, Kleinow T, Okresz L, Tiburcio A, Salchert K, del Pozo C, Schell J, Koncz C. (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* 20: 2742-2756.

**Galvao RM,** Kota U, Soderblom EJ, Goshe MB and Boss WF. (2008) Characterization of a new family of protein kinases from *Arabidopsis* containing phosphoinositide 3/4-kinase and ubiquitin-like domains. *Biochem. J.* 409:117-127.

**Johnson ES,** Ma PC, Ota IM, Varshavsky A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* 270:17442-56.

**Lee JH,** Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, YoonHJ, Chen H, He YJ, Xiong Y and Deng XW. (2008) Characterization of *Arabidopsis* and Rice DWD Proteins and Their Roles as Substrate Receptors for CUL4-RING E3 Ubiquitin Ligases. *The Plant Cell.* Jan.25

**Meusser B,** Hirsch C, Jarosh E and Sommer T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biol.* 7:766-72.

**Meyer HH,** Shorter JG, Seemann J, Pappin D and Warren G. (2000) A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *Embo J.* 19:2181-92.

**Nemeth K,** Salchert K, Putnoky P, Bhalerao R, Koncz-Kalman Z, Stankovic-Stangeland B, Bako L, Mathur J, Okresz L, Stabel S, Geigenberger P, Stitt M, Redei GP, Schell J, Koncz C. (1998) Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 12: 3059-3073.

**Ramadan K,** Bruderer R, Spiga FM, Popp O, Baur T, Gotta M and Meyer HH. (2007) Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature.* 450:1258-1263.

**Szakonyi D.** (2006) Genetic dissection of regulatory domains and signalling interactions of PRL1 WD-protein in *Arabidopsis*. PhD Thesis

**Yerushalmi S. and Green R.** (2007) The impact of putative ubiquitin proteins on flowering time in *Arabidopsis*. 18TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH